

НОВЫЙ ПОДХОД К ВЫЯВЛЕНИЮ ЗАЩИТНОЙ РОЛИ *ESHERICHIA COLI* В ОТНОШЕНИИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ НА БИНАРНЫЕ БИОПЛЕНКИ

© 2019 г. В. К. Плакунов^а *, Ю. А. Николаев^а, А. В. Ганнесен^а, Д. С. Чемаева^а, М. В. Журина^а

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”

Российской академии наук, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, 119071 Россия

*e-mail: plakunov@inmi.ru

Поступила в редакцию 03.12.2018 г.

После доработки 10.01.2019 г.

Принята к публикации 01.02.2019 г.

Получены бинарные биопленки, включающие грамположительные бактерии *Micrococcus thailandicus* НВ и *Kocuria rhizophila* штамм 4А-2Ж, а также грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* К-12 и штамм ET12567 pRAG56, содержащий в составе плазмиды фермент аминокликозидфосфотрансферазу, инактивирующую канамицин. Разработан новый кинетический метод избирательного выявления метаболически активных грамположительных бактерий в составе бинарных биопленок с *E. coli*, основанный на различиях в скорости восстановления акцептора электронов 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ). Установлено, что изученные штаммы *E. coli* не оказывали защитного эффекта при действии антибиотиков ванкомицина и оксациллина на грамположительные бактерии в составе формирующихся бинарных биопленок. Однако защитный эффект обнаружен в случае предформированных бинарных биопленок: рост грамположительных бактерий в бинарных биопленках наблюдался при тех концентрациях антибиотиков оксациллина и канамицина, при которых этот рост практически полностью подавлен в моновидовых биопленках данных бактерий. Наличие защитного эффекта подтверждено несколькими методами (динамика восстановления МТТ, денситометрическая оценка окрашивания биопленок, измерение оптической плотности экстрактов МТТ, подсчет числа КОЕ).

Ключевые слова: предформированные биопленки, биопленки-колонии, матрикс, антибиотики, устойчивость к антибиотикам, жизнеспособные бактерии, МТТ

DOI: 10.1134/S0026365619030091

Управление формированием микробных биопленок представляет собой важнейшее направление исследований этих сообществ, включающее не только борьбу с “вредными” биопленками микроорганизмов, вызывающих инфекционные болезни, а также биокоррозию технологических материалов, но и стимуляцию формирования “полезных” биопленок, актуальную для биотехнологических процессов. Комплекс этих проблем рассмотрен в нашем недавнем обзоре (Плакунов и соавт., 2017). Отсутствие серьезных успехов в борьбе с формированием биопленок, в первую очередь, объясняется тем, что в природных и искусственных экосистемах биопленки представляют собой мультивидовые сообщества (Ножевникова и соавт., 2015), тогда как поиск антибиопленочных агентов (в том числе антибиотиков) ведется, как правило, с использованием моновидовых вариантов. В результате антибиопленочные агенты, подобранные в опытах *in vitro*, во многих случаях оказыва-

ются неэффективными при испытаниях *in vivo*. Это объясняется более высокой устойчивостью микроорганизмов в мультивидовых биопленках к биоцидам (и стрессовым факторам) по сравнению с моновидовыми аналогами (Стрелкова и соавт., 2013). Данное явление обнаружено давно, однако механизмы этой устойчивости практически не изучены (Leriche et al., 2003; Burmølle et al., 2006; Lopes et al., 2012; Lee et al., 2014; Sanchez-Vizuetе et al., 2015). Теоретически устойчивость к биоцидам может быть обусловлена двумя основными причинами: во-первых, созданием барьера для диффузии биоцида внутрь биопленки за счет компонентов внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ), образуемого одним или несколькими членами биопленочного сообщества, и, во-вторых, инактивацией биоцида одним или несколькими микроорганизмами, входящими в состав биопленочного сообщества (рис. 1).

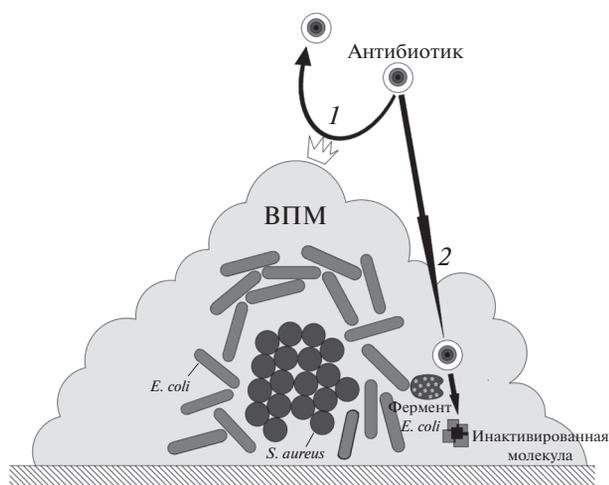


Рис. 1. Схема основных механизмов защиты микроорганизмов от действия антибиотиков в мультивидовых биопленках (на примере грамотрицательной *E. coli* и грамположительного *S. aureus*): 1 – создание барьера ВПМ для диффузии антибиотиков в биопленку, благодаря которому антибиотик не проникает внутрь биопленки, либо проникает, но не достигает клеток; 2 – инактивация антибиотиков под воздействием модифицирующих ферментов грамотрицательных бактерий.

Цель данной работы – изучение механизмов защитного эффекта в бинарных биопленках, проявляемого менее чувствительной к антибиотикам грамотрицательной бактерией *Escherichia coli* в отношении более чувствительных грамположительных бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованные бактерии. В качестве чувствительных к антибиотикам микроорганизмов использовали грамположительные бактерии: *Kocuria rhizophila* 4А-2Ж, изолированную из пластовых вод Ромашкинского нефтяного месторождения, т.е. экотопа, где она, как можно полагать, не контактировала с антибиотиками, а также *Micrococcus thailandicus* НВ, изолированный из загрязненной нефтепродуктами почвы. В качестве менее чувствительных к антибиотикам микроорганизмов нами проверены грамотрицательные бактерии – модели условно патогенных бактерий из коллекции лаборатории нефтяной микробиологии Института микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; 2 штамма *Escherichia coli* – К-12 и штамм ET12567 pRAG56, содержащий в составе плазмиды фермент аминоксидфосфотрансферазу, инактивирующую канамицин; *Pseudomonas chlororaphis* 449, *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 (штамм WT). Бактерии хранили при температуре 4–5°C (кроме

C. violaceum, которую хранили при комнатной температуре) на столбиках (5 мл) полужидкой среды LB (“Sigma”) под вазелиновым маслом. В качестве инокулята в опытах с биопленками использовали 24 ч культуры, выращенные в жидкой среде LB на качалке (150 об./мин) при 30°C, как указано в предыдущих работах (Мартьянов и соавт., 2015; Ганнесен и соавт., 2015).

Получение генно-инженерного штамма *E. coli*. Dam-негативный штамм-аналог штамма *E. coli* ET12567 с генотипом *ara-4, leuB6, fhuA31, lacY1, tsx78, glnV44, galK2, galT22, mcrA, dcm-6, hisG4, rfbD1.R (zgb210::Tn10) Tet^S, endA1, rspL136 (Str^R) dam13::Tn9 (Cam^R) xylA-5, mtl-1, thi-1, mcrB1, hsdR2* (New England Biolabs®) был приобретен в виде замороженной биомассы компетентных к трансформации клеток (каталожный номер C2925I на сайте <https://international.neb.com>). Биомассу хранили при –80°C. Плаزمида pRAG56, содержащая гены аминоксидфосфотрансферазы, зеленого и красного флуоресцирующих белков, была взята из коллекции Лаборатории микробиологии, сигналов и микроокружения LMSM EA4312 Университета Руана, Франция. Трансформацию производили методом теплового шока по протоколу производителя (<https://international.neb.com/products/c2925-dam-dcm-competent-e-coli>). Трансформированный штамм хранили при –80°C. Для работы клетки из условий с температурой –80°C переносили на жидкую среду LB, содержащую 200 мкг/мл канамицина и инкубировали 24 ч при 37°C. Затем на чашках Петри с агаризованной средой LB с той же концентрацией канамицина получали отдельные колонии, которые использовали в работе для получения культуры.

Получение и изучение биопленок. С целью предварительного подбора оптимального сочетания микроорганизмов в бинарных биопленках использовали метод формирования биопленок-колоний (Si et al., 2016). Для получения моновидовых биопленок на поверхность плотной питательной среды LB наносили по 20 мкл суспензий 24 ч культур, разбавленных жидкой питательной средой LB до условной (светопоглощение + светорассеяние) оптической плотности (ОП), равной 1.0 при 540 нм. Для получения бинарных биопленок в стерильных пробирках предварительно смешивали разбавленные суспензии (ОП = 2.0) в соотношении 1 : 1 и наносили на поверхность среды также в количестве 20 мкл. После нанесения культуры чашки Петри инкубировали 48 ч при 30°C и оценивали рост бактерий визуально, а также путем высева из бинарных биопленок-колоний на плотную среду LB. В контрольных экспериментах мы показали, что двукратное увеличение плотности популяции бактерий в посевном материале (возникающее при формировании бинарных биопленок)

не влияет на чувствительность к используемым антибиотикам планктонных культур исследуемых бактерий в жидкой среде LB и их моновидовых биопленок, выращиваемых на фильтрах из стекловолокна (Плакунов и соавт., 2016).

Определение метаболически активных бактерий в биопленках. Для количественного определения жизнеспособных бактерий в моновидовых и бинарных биопленках использовали разработанный нами метод с применением фильтров из стекловолокна (Whatman GF/F, диаметр пор 0.6–0.8 мкм) размером 2.5 × 2.5 см (Плакунов и соавт., 2016).

В случае изучения действия антибиотиков на биопленки, находящиеся в стадии формирования, по 50 мкл суспензий моновидовых и бинарных культур, разведенных как описано в предыдущем разделе, наносили на фильтры, помещенные на поверхность плотной среды LB без добавок (контроль), а также на фильтры, помещенные на поверхность плотной среды LB, содержащей разные концентрации исследуемых антибиотиков. Чашки с фильтрами инкубировали 24 ч при 30°C. Для оценки количества метаболически активных бактерий в биопленках, каждый фильтр пинцетом снимали с поверхности плотной среды и инкубировали в 5 мл 0.1% раствора МТТ в LB в темноте при 30°C до полного проявления окрашивания (30–60 мин). Оптимальное время окрашивания устанавливали путем экстракции образовавшегося формазана диметилсульфоксидом (ДМСО) и измерения ОП экстракта в динамике процесса окрашивания. Каждый фильтр помещали в пробирку с 3 мл ДМСО квалификации “х. ч.” и выдерживали в темноте при комнатной температуре до полной экстракции образовавшегося формазана. Оптическую плотность раствора формазана измеряли при 595 нм на фотокolorиметре КФК-2МП.

В случае изучения действия антибиотиков на предформированные биопленки фильтры с нанесенными суспензиями разбавленных (как в предыдущем случае) культур сначала помещали на поверхность чашек с плотной средой LB без антибиотика, инкубировали 5–6 ч при 30°C (или 24 ч при комнатной температуре, 24–25°C) для предформирования биопленок (Стрелкова и соавт., 2012), а затем переносили фильтры на чашки с исследуемыми концентрациями антибиотиков (контрольная чашка антибиотика не содержала) и инкубировали еще 24 ч при 30°C. Окрашивание фильтров проводили как в предыдущем случае.

Новый кинетический метод выявления защитного действия. Как мы установили, скорость восстановления МТТ изучаемыми грамположительными бактериями заметно выше, чем скорость его восстановления штаммами *E. coli*. Поэтому изме-

рение краткосрочной динамики восстановления МТТ может быть использовано для преимущественного выявления метаболически активных (жизнеспособных) клеток грамположительных бактерий в составе бинарных биопленок, содержащих *E. coli*. С этой целью после инкубации с антибиотиками (как в предыдущем разделе методики) фильтры обрабатывали в течение 10 с 0.01% раствором МТТ (т.е. разбавленным в 10 раз по сравнению со стандартной методикой) и помещали на фильтровальную бумагу. Процесс развития окраски фиксировали видеочкамерой в течение нескольких минут, фотографии использовали для денситометрической оценки скорости восстановления МТТ. При наличии защитного эффекта скорость окрашивания в бинарной биопленке превышала суммарную скорость окрашивания моновидовых биопленок (поскольку в моновидовых биопленках рост грамположительных бактерий при использованных концентрациях антибиотиков был сильно подавлен). Фильтры быстро промывали дистиллированной водой и помещали в ДМСО для экстракции. Дальнейшие измерения проводили, как в стандартных экспериментах.

Определение числа КОЕ. Для определения КОЕ использовали разработанную в лаборатории методику (Плакунов и соавт., 2016). С этой целью фильтры с выращенными биопленками стерильно диспергировали стеклянной палочкой в 10 мл 1% раствора NaCl и подвергали интенсивному встряхиванию на смесителе Vortex-ZX3. После оседания фрагментов фильтра готовили 10-кратные разведения в стерильном 1% растворе NaCl и высевали по 50 мкл на чашки Петри со средой LA. Пробы инкубировали 48 ч при 30°C, после чего подсчитывали число колоний.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета OriginLab 8.6. Поскольку тест на нормальность закона варьирования данных в наших экспериментах дал отрицательный результат, для оценки достоверности различий применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни–Вилкоксона при $p < 0.05$. Для графического отображения полученных закономерностей использовали алгоритм выбора типичного эксперимента (Paulson, 2008). Выравнивание графиков производили с помощью функции B-spline.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор микроорганизмов для формирования бинарных биопленок. Путем высевов на плотную среду LB было установлено, что в условиях наших экспериментов использованные грамположительные бактерии практически не выживают в

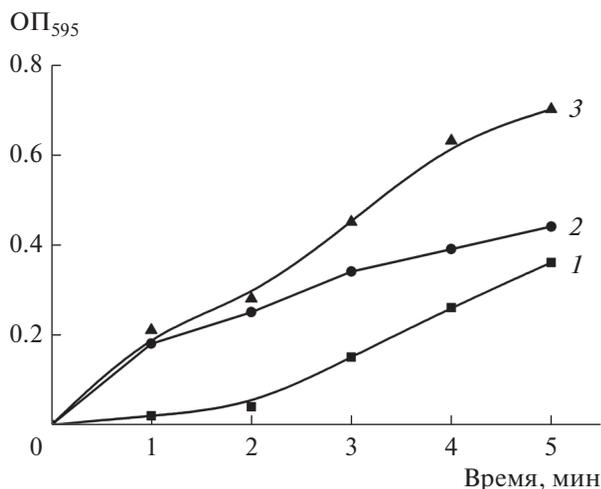


Рис. 2. Сравнение динамики восстановления 0.01% раствора МТТ моновидовыми и бинарной предформированными биопленками. 1 — моновидовая биопленка *E. coli* ET12567 pRAG56; 2 — моновидовая биопленка *M. thailandicus* НВ; 3 — бинарная биопленка данных бактерий.

бинарных биопленках-колониях в процессе их формирования совместно с бактериями рода *Pseudomonas*, а также с *C. violaceum*, вероятно, из-за воздействия образуемых этими грамотрицательными партнерами антибактериальных веществ (феназинов и виолацеина). Хотя в природных условиях при низких плотностях микробных популяций выживание грамположительных бактерий в таких сочетаниях с грамотрицательными бактериями вполне возможно (Yang et al., 2011), для количественных лабораторных опытов использование популяций с низкой плотностью методически непригодно. Наилучшими партнерами в наших экспериментах оказались штаммы *E. coli*, не вызывающие подавления роста изучаемых грамположительных бактерий. Поэтому в дальнейших исследованиях именно они были использованы для получения бинарных биопленок с грамположительными бактериями. Один из типичных примеров с пигментированной культурой *K. rhizophila* 4А-2Ж приведен на рис. 1S. Аналогичная ситуация (доказанная путем высевов на плотную среду LB) характерна для *M. thailandicus* НВ (не показано).

Действие антибиотиков на формирующиеся биопленки. Известно, что микробные биопленки в стадии формирования наиболее чувствительны к биоцидам (Стрелкова и соавт., 2012; Плакунов и соавт., 2017). Поэтому для разработки стратегии борьбы с биопленками важно установить, может ли защитный эффект *E. coli* проявляться на начальных этапах формирования бинарных биопленок. С этой целью биопленки-колонии форми-

вали на плотной среде, содержащей антибиотик в концентрации, практически полностью подавляющей рост планктонных культур изучаемых грамположительных бактерий.

В предварительных опытах с колониями-биопленками в стадии формирования антибиотик ванкомицин в концентрации 10 мкг/мл полностью подавлял рост моновидовой биопленки *K. rhizophila*, но существенно не влиял на рост моновидовой биопленки *E. coli*. Высевы на плотную среду LB, как из зоны, соответствующей моновидовой биопленке, так и из зоны бинарной биопленки не позволили обнаружить жизнеспособные клетки *K. rhizophila* 4А-2Ж. По такой же схеме были проведены эксперименты с оксациллином (5 мкг/мл). И в этом случае высевы из зоны, соответствующей моновидовой и бинарной колонии-биопленке не позволили обнаружить наличие жизнеспособных клеток *K. rhizophila* 4А-2Ж. Таким образом, результатов, которые бы свидетельствовали о наличии защитного эффекта в экспериментах с формирующимися биопленками получено не было.

Действие антибиотиков на предформированные биопленки. Отсутствие защитного эффекта в случае формирующихся биопленок могло быть связано с тем, что проявление ингибиторного действия антибиотиков опережает формирование бинарной биопленки. Поэтому в дальнейших экспериментах мы осуществляли предформирование бинарных биопленок на фильтрах, помещенных на плотную среду LB без антибиотика, а затем переносили эти биопленки на среду LB, содержащую разные концентрации изучаемого антибиотика. В первой серии экспериментов для формирования моновидовых и бинарных биопленок в качестве грамположительного и грамотрицательного партнеров использовали, соответственно, *M. thailandicus* НВ и *E. coli* ET12567 pRAG56. В качестве антибиотика использовали канамицин, поскольку данный штамм *E. coli* устойчив к этому антибиотику. В этих экспериментах высевы на плотную среду из моновидовых и бинарных биопленок обнаруживали некоторый рост *Micrococcus thailandicus* НВ при всех использованных в опытах с биопленками концентрациях канамицина (до 100 мкг/мл). Рост планктонной культуры грамположительного партнера полностью подавлялся при концентрации антибиотика 0.5–1 мкг/мл.

Качественно присутствие метаболически активных клеток на фильтрах оценивали кинетически по скорости окрашивания МТТ. Как показано нами в контрольных (без антибиотиков) экспериментах, клетки использованных грамположительных бактерий обладают значительно более высокой скоростью восстановления этого акцептора электронов по сравнению с клетками *E. coli*. На рис. 2

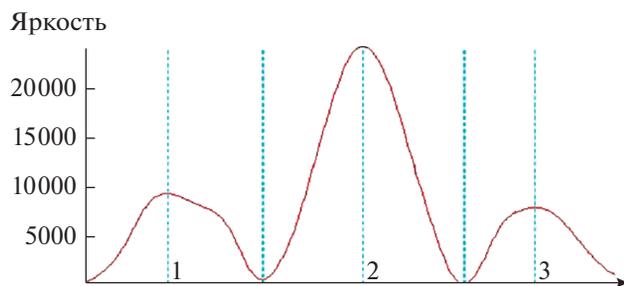


Рис. 3. Метаболическая активность бактерий (в присутствии 25 мкг/мл канамицина), измеренная денситометрически на фильтрах, представленных на рис. 2S. 1 – моновидовая биопленка *M. thailandicus* HB (площадь пика 820126 пикселей); 2 – бинарная биопленка *M. thailandicus* HB + *E. coli* ET12567 pRAG56 (площадь пика 2041954 пикселей); 3 – моновидовая биопленка *E. coli* ET12567 pRAG56 (площадь пика 620941 пикселей).

представлены результаты на примере *M. thailandicus* HB и *E. coli* ET12567 pRAG56.

Как следует из данных, приведенных на рис. 2, наибольшие различия в скоростях восстановления МТТ наблюдаются через 1–3 мин инкубации, поэтому для выявления защитного эффекта в бинарных биопленках был выбран период инкубации, равный 2 мин (т.е. в середине этого интервала). В отсутствие антибиотиков скорость восстановления МТТ в бинарной биопленке должна быть равна сумме скоростей восстановления МТТ в моновидовых биопленках (в реальных экспериментах суммарная скорость несколько ниже, вероятно, в связи с конкуренцией партнеров за акцептор). Наличие защитного эффекта в присутствии антибиотика должно проявляться в накоплении в составе бинарной биопленки большего количества жизнеспособных клеток грамположительного партнера, по сравнению с моновидовой биопленкой, а, следовательно, скорость восстановления МТТ в бинарной биопленке в этом случае должна быть выше суммы скоростей восстановления МТТ в моновидовых биопленках. Эксперименты показали, что данный эффект действительно имеет место (рис. 2S).

Можно видеть, что в бинарной биопленке восстановление МТТ протекает со скоростью, характерной для грамположительного микроорганизма *M. thailandicus* HB, значительно превышающей скорость восстановления МТТ в моновидовой его биопленке. Это указывает на более высокое содержание жизнеспособных клеток *M. thailandicus* HB в бинарной биопленке по сравнению с моновидовой.

Для количественной оценки защитного эффекта в кратковременных экспериментах проведено денситометрическое определение интен-

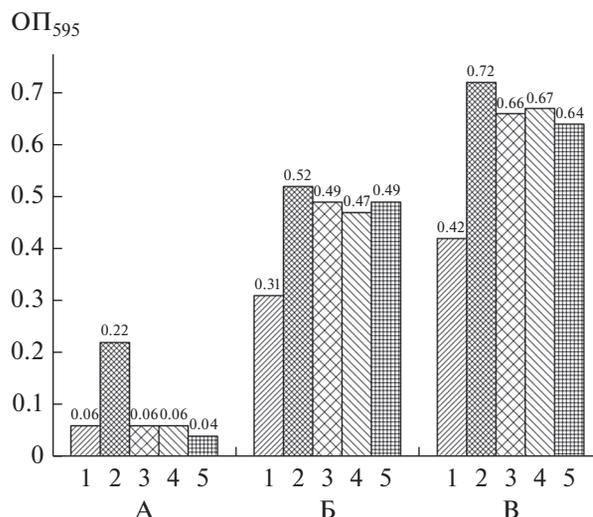


Рис. 4. Метаболическая активность бактерий при действии канамицина на моновидовые и бинарную предформированные биопленки (по оси Y указана оптическая плотность экстракта формазана при 595 нм). А – моновидовая биопленка *M. thailandicus* HB; Б – моновидовая биопленка *E. coli* ET12567 pRAG56; В – бинарная биопленка *M. thailandicus* HB + *E. coli* ET12567 pRAG56. 1 – исходная биопленка; 2 – контроль без канамицина; 3–5 – в присутствии канамицина (3 – 25 мкг/мл; 4 – 50 мкг/мл; 5 – 100 мкг/мл).

сивности восстановления МТТ. Результаты представлены на рис. 3. По данным денситометрии, оптическая плотность (измеряемая как “яркость”) окрашивания бинарной биопленки в 1.4 раза (по площади пика) превышает суммарную оптическую плотность окраски моновидовых биопленок. Поскольку окрашивание МТТ характеризует, в первую очередь, количество жизнеспособных клеток грамположительной бактерии *M. thailandicus* HB, полученные результаты свидетельствуют о наличии значительного защитного эффекта, оказываемого грамотрицательной бактерией *E. coli* ET12567 pRAG56 в отношении грамположительной бактерии *M. thailandicus* HB, предохраняющей последнюю от ингибиторного действия канамицина.

Для оценки величины защитного эффекта в длительных экспериментах измеряли оптическую плотность (при 595 нм) экстракта формазана после восстановления 0.1% МТТ, извлеченного с фильтров с предформированными биопленками. Исходные биопленки были предформированы 24 ч при комнатной температуре, контрольные (без канамицина), а также биопленки в присутствии канамицина – инкубированы еще 24 ч при 30°C (рис. 4).

Результаты, представленные на рис. 4, показывают, что оптическая плотность экстрактов

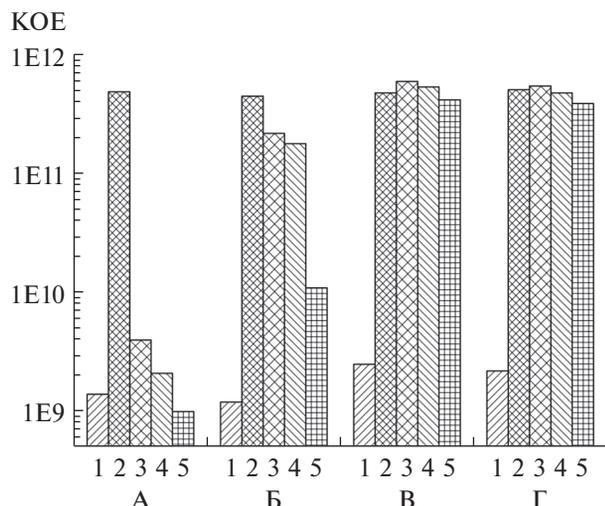


Рис 5. Число КОЕ в моновидовых (А, В) и бинарной (Б, Г) преформированных биопленках *M. thailandicus* НВ (А, Б) и *E. coli* ET12567 pRAG56 (В, Г). 1 – исходная биопленка; 2 – контроль без канамицина; 3–5 – в присутствии канамицина (3 – 25 мкг/мл; 4 – 50 мкг/мл; 5 – 100 мкг/мл).

формазана в бинарной биопленке превышает сумму оптических плотностей экстрактов, полученных из моновидовых биопленок. Поскольку образование формазана является индикатором наличия жизнеспособных бактерий, а культура *E. coli* ET12567 pRAG56 нечувствительна к канамицину, избыточное количество формазана свидетельствует о том, что в бинарной биопленке присутствует больше жизнеспособных клеток культуры *M. thailandicus* НВ, чем при тех же концентрациях канамицина в моновидовой биопленке данной культуры. Эти результаты коррелируют с результатами, полученными кинетическим методом, и подтверждают вывод о том, что в бинарной биопленке проявляется защитный от действия канамицина эффект грамотрицательной культуры *E. coli* ET12567 pRAG56 на грамположительную культуру *M. thailandicus* НВ. Этот вывод подтвержден определением числа КОЕ после диспергирования (рис. 5 и 3S).

Можно видеть, что количество жизнеспособных клеток *M. thailandicus* НВ в бинарной биопленке приблизительно на 2 порядка превышает количество жизнеспособных клеток в моновидовой биопленке, что свидетельствует о наличии защитного эффекта со стороны *E. coli* ET12567 pRAG56.

Для проверки, не связан ли защитный эффект со спецификой антибиотика и использованных бактерий, мы проверили другой антибиотик – оксациллин, а также другую пару микроорганизмов: грамположительный *K. rhizophila* 4А-2Ж и

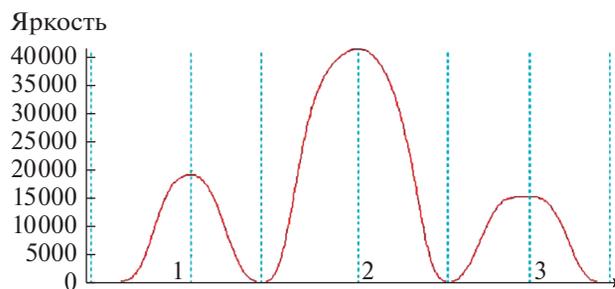


Рис. 6. Количество метаболически активных клеток, измеренное денситометрически на фильтрах, представленных на рис. 4S. 1 – моновидовая биопленка *K. rhizophila* 4А-2Ж (площадь пика 954901 пикселей); 2 – бинарная биопленка *K. rhizophila* 4А-2Ж + *E. coli* К-12 (площадь пика 311775 пикселей); 3 – моновидовая биопленка *E. coli* К-12 (площадь пика 930690 пикселей).

граммотрицательный *E. coli* К-12, обладающий природной устойчивостью к оксациллину.

Постановку эксперимента осуществляли по той же схеме. Количество метаболически активных клеток на фильтрах оценивали кинетически по скорости окрашивания МТТ (рис. 4S).

Данные по оптической плотности (измеряемой как “яркость”) окраски фильтров, представленные на рис. 6, показывают, что в бинарной биопленке количество формазана в 1.65 (по площади пика) выше, чем в сумме моновидовых биопленок. Таким образом, в данном эксперименте обнаружен заметный защитный эффект в отношении *K. rhizophila* 4А-4Ж, проявляемый в бинарной биопленке со стороны *E. coli* К-12. Следует отметить, что аналогичный по величине защитный эффект обнаружен нами и при более низких концентрациях оксациллина (5 и 10 мкг/мл), причем во всех этих случаях рост *E. coli* К-12 в моновидовых ее биопленках не зависел от присутствия оксациллина. Для альтернативной количественной оценки содержания метаболически активных клеток формазан экстрагировали и измеряли оптическую плотность экстрактов (рис. 7).

Данные, приведенные на рис. 7, показывают, что оптическая плотность экстрактов формазана в бинарной биопленке превышает сумму оптических плотностей экстрактов, полученных из моновидовых биопленок так же, как и в предыдущем случае (рис. 4). Это превышение является статистически достоверным, хотя оно имеет меньший масштаб, чем в ранее изученной паре партнеров.

Наличие защитного эффекта подтверждено определением числа КОЕ после диспергирования преформированных и инкубированных в присутствии оксациллина моновидовых и бинарной

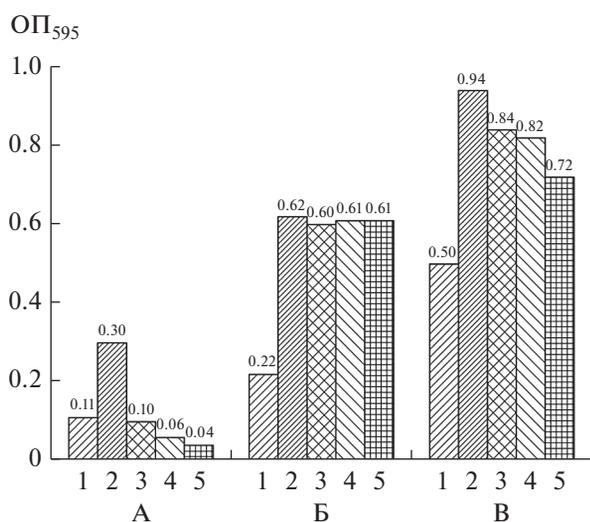


Рис. 7. Метаболическая активность бактерий при действии канамицина на моновидовые и бинарную предформированные биопленки (указана оптическая плотность экстракта формазана при 595 нм). А — моновидовая биопленка *K. rhizophila* 4А-2Ж; Б — моновидовая биопленка *E. coli* К-12; В — бинарная биопленка *K. rhizophila* 4А-2Ж + *E. coli* К-12. 1 — исходная биопленка; 2 — контроль без оксациллина; 3–5 — в присутствии оксациллина (3 — 5 мкг/мл; 4 — 10 мкг/мл; 5 — 25 мкг/мл).

биопленок изучаемых бактерий. Данные представлены на рис. 5S.

Благодаря различной окраске колоний изучаемых бактерий, наличие повышенного содержания клеток *K. rhizophila* 4А-2Ж в бинарной биопленке заметно уже визуально. Количественная оценка числа КОЕ приведена на рис. 8. Результаты подсчета КОЕ показывают, что в бинарной биопленке число жизнеспособных клеток *K. rhizophila* 4А-2Ж более чем на порядок превышает их число в моновидовой биопленке, что свидетельствует о проявлении защитного эффекта *E. coli* К-12. Хотя определение КОЕ в случае биопленок связано с методическими трудностями из-за возможности неполного диспергирования ВПМ и формирования микроколоний из агрегатов клеток, тем не менее, корреляция данных оценки количества жизнеспособных клеток в биопленках по реакции с МТТ с подсчетом КОЕ свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Подводя итог, можно утверждать, что новый, предложенный нами кинетический метод, основанный на восстановлении МТТ метаболически активными клетками микроорганизмов, позволяет просто и надежно выявить наличие защитного эффекта против действия использованных антибиотиков, оказываемого грамотрицательными бактериями *E. coli* в отношении изученных

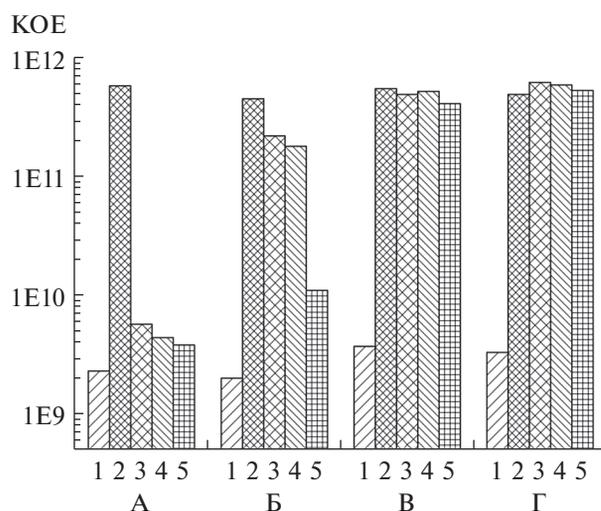


Рис. 8. Число КОЕ в моновидовых (А, В) и бинарной (Б, Г) предформированных биопленках *K. rhizophila* 4А-2Ж (А, Б) и *E. coli* К-12 (В, Г). 1 — исходная биопленка; 2 — контроль без оксациллина; 3–5 — в присутствии оксациллина (3 — 5 мкг/мл; 4 — 10 мкг/мл; 5 — 25 мкг/мл).

грамположительных бактерий. Качественная визуальная оценка защитного эффекта полностью коррелирует с его количественным измерением методами денситометрии, спектрофотометрии и определения числа КОЕ.

Для механизма этого явления можно предложить несколько гипотез. Прежде всего, необходимо отметить, что защитный эффект в бинарных биопленках нельзя объяснить простым суммированием плотности популяций и толщины ВПМ двух комбинируемых микроорганизмов, поскольку для синтеза ВПМ грамположительной бактерии необходим ее рост при использованных концентрациях антибиотиков, при которых этот рост в моновидовой биопленке подавлен почти полностью. И, как мы уже упоминали, само по себе двукратное увеличение плотности исходной популяции при формировании биопленки на чувствительность бактерий к данным антибиотикам практически не влияет.

Нами использованы два типа штаммов *E. coli*: штамм К-12 с природной устойчивостью к оксациллину и штамм ET12567 pRAG56 с приобретенной устойчивостью к канамицину (наличие фермента, инактивирующего антибиотик). Устойчивость *E. coli* К-12 к оксациллину определяется тремя механизмами: барьером диффузии, формируемым наружной мембраной клетки, системой экскреции этого антибиотика, а также наличием β-лактамазы (Mazzarioli et al., 2000). Первые два механизма не могут внести существенный вклад в защитный эффект в биопленках (в соответствии со схемой

на рис. 1). Поскольку у штамма дикого типа *E. coli* K-12 активность β -лактамазы невелика (Normark et al., 1977), основную роль должен играть барьер диффузии, формируемый ВПМ биопленки *E. coli*. В случае штамма ET12567 pRAG56 определяющую роль, по-видимому, играет деградация антибиотика канамицина, хотя барьерная функция ВПМ также может вносить определенный вклад в защитный механизм.

Обнаруженный защитный эффект может объяснять малую эффективность антибиотикотерапии в случае заболеваний, вызываемых формированием мультивидовых биопленок либо самими патогенными микроорганизмами, либо патогенными микроорганизмами и их малочувствительными к антибиотикам сапротрофными спутниками.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дополнительные материалы к статье доступны (doi 10.1134/S0026365619030091).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ганнесен А.В., Журина М.В., Веселова М.А., Хмель И.А., Плакунов В.К. Регуляция процесса формирования биопленок *Pseudomonas chlororaphis* в системе *in vitro* // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 281–290.
- Gannesen A.V., Zhurina M.V., Veselova M.A., Khmel' I.A., Plakunov V.K. Regulation of biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* in an *in vitro* system // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 319–327.
- Мартьянов С.В., Журина М.В., Эль-Регистан Г.И., Плакунов В.К. Активирующее действие азитромицина на формирование бактериальных биопленок и борьба с этим явлением // Микробиология. 2015. Т. 84. № 1. С. 27–36.
- Mart'yanov S.V., Zhurina M.V., El'Registan G.I., Plakunov V.K. Activation and prevention of formation of bacterial biofilms by azithromycin // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. № 6. P. 723–731.
- Ножевникова А.Н., Бочкова Е.А., Плакунов В.К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии // Микробиология. 2015. Т. 84. № 6. С. 623–644.
- Nozhevnikova A.N., Botchkova E.A., Plakunov V.K. Multi-species biofilms in ecology, medicine, and biotechnology // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 731–750.
- Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты (обзор) // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 402–420.
- Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. Controlling of microbial biofilms formation: anti- and probiofilm agents // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 423–438.
- Стрелкова Е.А., Журина М.В., Плакунов В.К., Беляев С.С. Стимуляция антибиотиками процесса формирования бактериальных биопленок // Микробиология. 2012. Т. 81. № 2. С. 282–285.
- Strelkova E.A., Zhurina M.V., Plakunov V.K., Belyaev S.S. Stimulation of biofilm formation by antibiotics // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 259–262.
- Burmölle M., Webb J.S., Rao D., Hansen L.H., Sørensen S.J., Kjelleberg S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 3916–3923.
- Lee K.W., Periasamy S., Mukherjee M., Xie C., Kjelleberg S., Rice S.A. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm // ISME J. 2014. V. 8. P. 894–907.
- Leriché V., Briandet R., Carpentier B. Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another // Environ. Microbiol. 2003. V. 5. P. 64–71.
- Lopes S.P., Ceri H., Azevedo N.F., Pereira M.O. Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection // Int. J. Antimicrob. Agents. 2012. V. 40. P. 260–263.
- Mazzariol A., Cornaglia G., Nikaido H. Contributions of the AmpC beta-lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to beta-lactams // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 1387–1390.
- Normark S., Edlund T., Grundström T., Bergström S., Wolf-Watz H. *Escherichia coli* K-12 mutants hyperproducing chromosomal beta-lactamase by gene repetitions // J. Bacteriol. 1977. V. 132. P. 912–922.
- Paulson D.S. Biostatistics and Microbiology. Springer Science + Business Media. LLS, USA, 2008. 216 p.
- Sanchez-Vizquete P., Orgaz B., Aymerich S., Le Coq D., Briandet R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 705. doi 10.3389/fmicb.2015.0070
- Si T., Li B., Zhang K., Xu Y., Zhao H., Sweedler J.V. Characterization of *Bacillus subtilis* colony biofilms via mass spectrometry and fluorescence imaging // J. Proteome Res. 2016. V. 15. P. 1955–1962.
- Yang L., Liu Y., Wu H., Hóiby N., Molin S., Song Z.J. Current understanding of multi-species biofilms // Int. J. Oral. Sci. 2011. V. 3. P. 74–81.

A New Approach to Detection of the Protective Effect of *Escherichia coli* on Gram-Positive Bacteria in Binary Biofilms in the Presence of Antibiotics

V. K. Plakunov^{1,*}, Yu. A. Nikolaev¹, A. V. Gannesen¹, D. S. Chemaeva¹, and M. V. Zhurina¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: plakunov@inmi.ru

Received December 3, 2018; revised January 10, 2019; accepted February 1, 2019

Abstract—Binary biofilms containing gram-positive bacteria *Micrococcus thailandicus* HB or *Kocuria rhizophila* strain 4A-2G and gram-negative bacteria *Escherichia coli* strain K-12 or strain ET12567 pRAG56 were obtained. Strain *E. coli* ET12567 contained a plasmid encoding aminoglycoside phosphotransferase, the enzyme which inactivates kanamycin. A new kinetic approach was developed for selective detection of metabolically active gram-positive bacteria in binary biofilms with *E. coli*, based on the differences in reduction rate of the electron acceptor, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) (MTT). It was found that the studied *E. coli* strains did not exert a protective effect upon the action of antibiotics vancomycin and oxacillin on gram-positive bacteria in the binary biofilms under formation. However, a protective effect was found in the case of preformed binary biofilms: the growth of gram-positive bacteria in binary biofilms was observed at the concentrations of antibiotics oxacillin and kanamycin, which almost completely suppressed growth in the mono-species biofilms of these gram-positive bacteria. The presence of a protective effect was confirmed by several methods (dynamics of MTT reduction, densitometric evaluation of biofilm staining, measurement of the optical density of MTT extracts, and CFU enumeration).

Keywords: preformed biofilms, colony biofilms, matrix, antibiotics, antibiotic resistance, metabolically active bacteria, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) MTT